

# EFFECTO DE LA INTERACCIÓN DE HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES Y PSEUDOMONAS FLUORESCENS SOBRE EL DESARROLLO Y LA NUTRICIÓN DE PLÁNTULAS DE TOMATE DE ÁRBOL (SOLANUM BETACEUM)

Echeverría Elsa Johana.<sup>1</sup>, Ponce Lourdes Karina.<sup>2</sup>, Medina María Emilia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología del Suelo  
Centro de Investigaciones Científicas  
Escuela Politécnica del Ejército  
Sangolquí, Ecuador

<sup>2</sup>Carrera de Ingeniería en Biotecnología  
Departamento de Ciencias de la Vida  
Escuela Politécnica del Ejército  
Sangolquí, Ecuador.

## RESUMEN

El cultivo de tomate de árbol es una especie frutal de gran aceptación en el mercado nacional e internacional, por su calidad organoléptica y sus propiedades medicinales. Por ello, es necesario contribuir a mejorar la nutrición y desarrollo de este cultivo mediante el uso de microorganismos benéficos de la rizósfera, ya que la microbiota ha sido deteriorada por el uso intensivo de fertilizantes químicos, que ha provocado una dependencia de las especies vegetales hacia los productos sintéticos. En la presente investigación se utilizaron dos tipos diferentes de biofertilizantes (microorganismos nativos de tomate de árbol) uno constituido por un consorcio de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y otro formado por rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) *Pseudomonas fluorescens*. Al finalizar el ensayo (después de cuatro meses) se observó un mayor desarrollo vegetal en las plantas co-inoculadas con HMA y la cepa Z5P6 (en concentración de  $6,0 \times 10^8$  UFC/ml) presentando incrementos, respecto a los controles una vez en la altura, dos veces en el área foliar y tres veces en la biomasa aérea. Tanto las plantas micorrizadas como las co-inoculadas (con HMA y *P. fluorescens* cepa Z5P6) mostraron una mayor absorción de fósforo y nitrógeno en comparación con aquellas con inoculación simple de rizobacterias, probablemente, debido a la capacidad que presentan los microorganismos para descomponer la materia orgánica, logrando movilidad y mayor asimilación de nutrientes.

## ABSTRACT

The sweet tomato crop is a fruit species of great acceptance in the national and international markets for their organoleptic and medicinal properties. Therefore, it's necessary to contribute to improve nutrition and development of this crop with the use of beneficial microorganisms on the rhizosphere, microbiota that has been damaged by the intensive use of chemical fertilizers, which in turn have led to dependence on plant species to synthetic products. In the present investigation it was used two different types of biofertilizers (native microorganisms of sweet tomato): one formed by a consortium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and other formed by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) *Pseudomonas fluorescens*. At the end of the test (four months) the results showed greater growth for co-inoculated plant with AMF and Z5P6 strain (at a concentration of  $6.0 \times 10^8$  UFC/ml) showing an increase one time the height, twice the leaf area and three time the aerial biomass and root weight compared to control plants. Both mycorrhizal plants as co-inoculated (AMF and *P. fluorescens* Z5P6 strain) showed a greater absorption of



phosphorus and nitrogen compared with those with single inoculation of rhizobacteria and control group, probably, these results were due to the ability of microorganisms to decompose organic matter, achieving greater mobility and assimilation of nutrients.

## **1 INTRODUCCIÓN**

El tomate de árbol es una especie frutal reconocida por sus atributos organolépticos y propiedades nutricionales. Por ello, es necesario contribuir a mejorar la nutrición y desarrollo de este cultivo mediante el fortalecimiento de una agricultura sustentable, con el uso de biofertilizantes (microbiota nativa del cultivo en estudio) ayudando a preservar el medio ambiente y a la vez mejorando la calidad de vida. Los biofertilizantes son microorganismos capaces de producir efectos beneficiosos en estadíos tempranos de las especies vegetales, mejorando el desarrollo de la biomasa de las raíces y brotes de la plantas, aumentando la germinación de plántulas, vigor, altura, contenido de nutrientes, presencia de clorofila, acelerando el tiempo de floración y brindando protección frente a fitopatógenos radicales (Saharan, B.S. & Nehra, V., 2011).

Entre los biofertilizantes utilizados en el presente ensayo se aplicaron hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y rizobacterias *Pseudomonas fluorescens*, los primeros realizan simbiosis con las raíces de las especies vegetales suplementando de agua y nutrientes (principalmente fósforo y nitrógeno) a la planta y en retribución, la especie vegetal le provee de carbohidratos y un nicho para su desarrollo (Parniske, 2008). Por su parte las *P. fluorescens* colonizan el sistema radicular de las plantas produciendo reguladores de crecimiento vegetal y aportando en la nutrición de las plantas mediante la solubilización de ciertos elementos como el fósforo y el nitrógeno (Ferrera y Alarcón, 2001).

Cuando estos dos microorganismos están presentes dentro de la rizósfera, las *P. fluorescens* facilitan la penetración de los HMA facilitando la simbiosis con las plantas, mediante la degradación de las paredes celulares y la laminilla media entre las células de la corteza de la raíz a través de la exudación de enzimas específicas que ayuden al proceso (Garbaye J, 2007).

En la presente investigación se utilizó un consorcio de hongos micorrícicos arbusculares y rizobacterias *Pseudomonas fluorescens* durante las primeras fases de crecimiento de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) cuya co-inoculación mejoró la absorción de nutrientes y el desarrollo del cultivo en estudio.

## **2 METODOLOGÍA**

Se realizaron muestreos en diferentes zonas de las provincias de Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua con cultivos de tomate de árbol semiorgánicos para el aislamiento de HMA y rizobacterias *Pseudomonas fluorescens*.

### **2.1 Identificación y multiplicación de los HMA**

Inicialmente para la identificación de las micorrizas se utilizó la técnica de tamizado húmedo y decantación propuesta por Gerdeman y Nicholson, 1963, modificada por Herrera *et al.*, 2004 y para determinar el porcentaje de colonización micorrícica se aplicó la metodología de Phillips y Hayman, 1970. Se seleccionó el sitio de muestreo con mayor número de esporas, para su posterior multiplicación del inóculo de HMA en cultivos trampa de avena durante tres meses.

## 2.2 Identificación y selección de *Pseudomonas fluorescens*

Se estandarizó la técnica para aislar e identificar las rizobacterias en estudio. Para ello se realizaron dos procesamientos, uno de raíces y otro de rizósfera. A partir de una solución madre se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-5}$ , de cada una, se sembraron por duplicado en *Pseudomonas Isolation Agar* (Difco), se incubaron a 28°C durante 24h. Se aislaron colonias de posibles *Pseudomonas* sp. y se inocularon por duplicado en cajas Petri con medio *Agar Pseudomonas F* (Himedia). Se observó uno de cada duplicado, bajo una lámpara de luz UV (254nm) y se seleccionaron las colonias fluorescentes. El duplicado se purificó en medio de cultivo *Trypticase Soy Agar* (Becton, Dickinson Co.) a fin de realizar la tinción Gram y pruebas bioquímicas según el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey 2005 (Palleroni, N. J., 2005) para la identificación de los posibles ejemplares de la especie en estudio *P. fluorescens*.

De los aislados identificados como *P. fluorescens*, se seleccionaron tres cepas para la aplicación en el ensayo, según su capacidad de solubilizar fosfato inorgánico (fosfato tricálcico) mediante una prueba cualitativa según el protocolo de Arvind G., *et al.*, 2007.

## 2.3 Mantenimiento del ensayo

El ensayo se desarrolló en un período de cuatro meses, inicialmente las plántulas de tomate de árbol fueron infectadas con 180g de inóculo (que contenía 655 esporas de HMA) quedando una disolución final de 1,09 esporas por gramo de suelo en cada maceta. Después de 30 días se colocaron las tres cepas de *P. fluorescens*: Z2P6, Z5P5 y Z5P6 en dos concentraciones  $1.5 \times 10^8$  y  $6.0 \times 10^8$  UFC/ml, según el diseño experimental.

# 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 3.1 Evaluación del desarrollo de las plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*)

Los resultados de las variables de crecimiento: altura, perímetro, área foliar, biomasa aérea y radical fueron analizados mediante ANOVA, utilizando una prueba de Tukey al 5%, durante la evaluación después de 120 días de ensayo. (Tabla 1). De manera general se observa que los tratamientos de HMA en combinación con *P. fluorescens* presentan los mayores rangos de significancia estadística, seguidos por los tratamientos con inoculación simple de rizobacterias que superan a las plantas control.

**Tabla 1.** Efecto de la inoculación simple y combinada de los HMA y las cepas de *P. fluorescens* en concentraciones de  $1.5 \times 10^8$  y  $6.0 \times 10^8$  UFC/ml sobre el desarrollo del tomate de árbol.

Tratamientos	Altura (cm)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Biomasa aérea fresca (g)	Biomasa radical fresca (g)
M1_B3.2	18,70 a	65,88 a	12,07 a	8,93 a
M1_B3.1	18,41 ab	63,10 a	11,42 a	8,75 a
M1_B2.2	17,83 abc	56,90 a	11,00 a	8,52 a
M1_B2.1	17,14 abc	64,30 a	10,99 a	8,26 a
M1_B1.2	16,30 abc	61,26 a	10,92 ab	7,78 ab
M1_B1.1	15,46 c	57,40 a	10,34 ab	7,36 ab
M1_B0	16,10 bc	60,22 a	11,12 a	8,59 a
M0_B3.2	10,22 de	32,89 bc	6,71 c	4,20 cd
M0_B3.1	11,33 d	40,89 b	8,42 bc	5,69 bc
M0_B2.2	9,54 de	27,33 bc	6,14 c	4,30 c
M0_B2.1	10,31 de	28,67 bc	6,07 c	4,38 c
M0_B1.2	10,42 de	25,56 c	6,97 c	4,24 c
M0:B1.1	10,33 de	28,67 bc	6,73 c	4,52 c
M0_B0	8,57 e	19,42 c	3,32 d	1,99 d

**M0=** sin HMA, **B0=** sin bacterias, **M1=** con 1.09 esporas/g

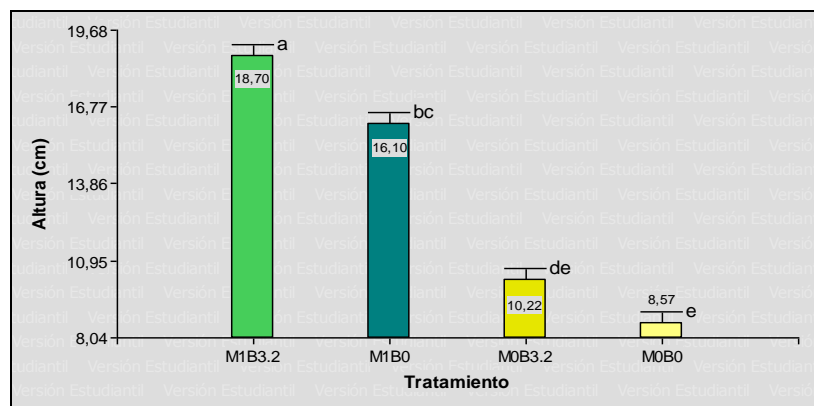
**B1.1=** *P. fluorescens* Z2P6 en conc.  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml, **B1.2=** *P. fluorescens* Z2P6 en conc.  $6.0 \times 10^8$  UFC/ml,

**B2.1=** *P. fluorescens* Z5P5 en conc.  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml, **B2.2=** *P. fluorescens* Z5P5 en conc.  $6.0 \times 10^8$  UFC/ml,

**B3.1=** *P. fluorescens* Z5P6 en conc.  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml, **B3.2=** *P. fluorescens* Z5P6 en conc.  $6.0 \times 10^8$  UFC/ml.

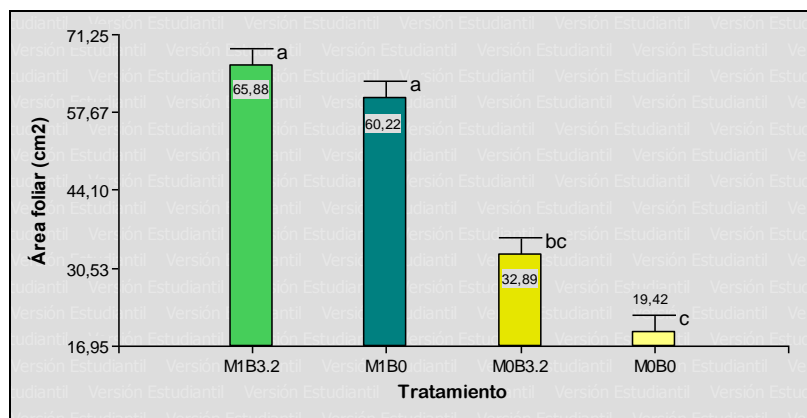
Dentro de cada columna, letras idénticas son estadísticamente iguales según el test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Como se muestra en la Tabla 1 y Figura 1, los valores promedios del tratamiento de co-inoculación entre la cepa Z5P6 de *P. fluorescens* y el consorcio de HMA mejora la altura de las plantas de tomate de árbol, siendo estadísticamente diferente de los demás tratamientos del ensayo. Según Cuesta y colaboradores (2004) esta respuesta positiva de las plantas a la inoculación dual disminuye el período de estancia de la especie vegetal en vivero y produce plántulas de mejor calidad fisiológica. Similares resultados fueron obtenidos por este autor con la inoculación doble de *P. fluorescens* y *Glomus mosseae* en plantas forestales de *Swietenia macrophylla x mahagoni*. Además, Staley y otros (1992) encontraron que al inocular *P. fluorescens* y HMA en plantas de alfalfa y trébol incrementaron en un 23% la altura respecto a los controles. Comparando los resultados de la altura en las plantas de tomate de árbol del presente ensayo, se logró un incremento de una vez con la aplicación dual en comparación con el tratamiento control.



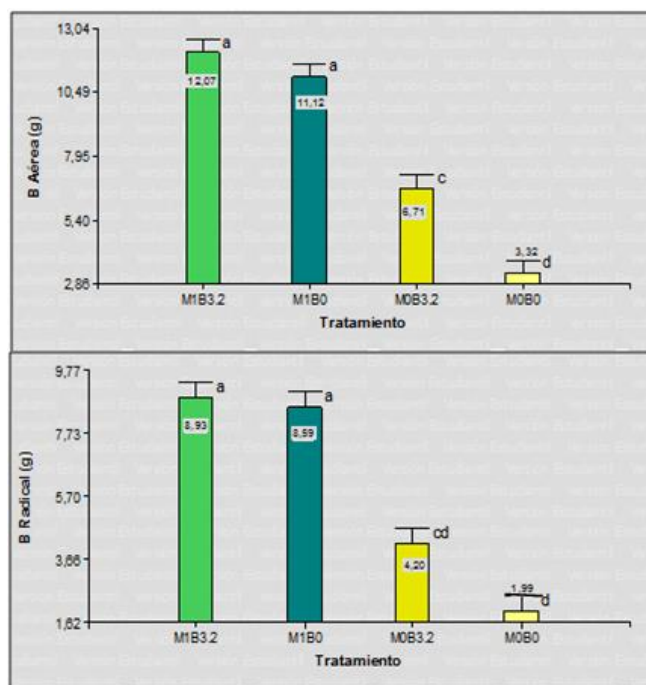
**Figura 1.** Efecto de la interacción simple y combinada entre los HMA y la cepa Z5P6 de *P.fluorescens* sobre la altura de las plantas de tomate de árbol.

Los valores promedios de la aplicación en conjunto de micorrizas y *P. fluorescens* y la inoculación simple de HMA presentaron el mismo nivel de significancia estadística en relación al área foliar (ver Tabla 1 y Figura 2) pero ambos tratamientos incrementaron el área foliar en relación a las plantas control.



**Figura 2.** Efecto de la interacción entre los HMA y la cepa Z5P6 sobre el área foliar

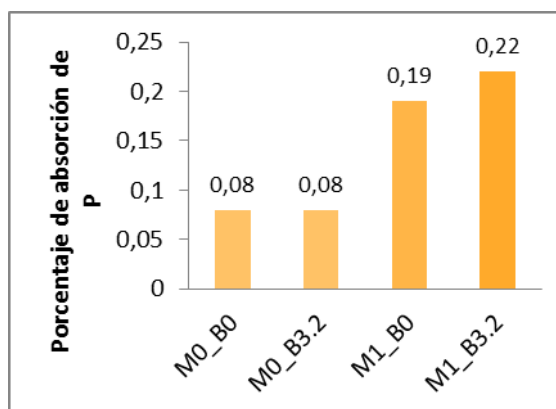
Las plantas inoculadas con la combinación de HMA y *Pseudomonas fluorescens* presentan un valor promedio de la biomasa aérea y radicular estadísticamente igual al alcanzado por la aplicación simple de micorrizas, no obstante superiores a los tratamientos con la adición simple de rizobacterias y al control (ver Tabla 1. Figura 3). Similares resultados fueron obtenidos por Cuesta y colaboradores (2004) donde la co-inoculación HMA-bacterias y la inoculación exclusiva de micorrizas superan significativamente al testigo en peso seco de las plántulas de *Swietenia macrophylla x mahagoni*. Con estos resultados se evidencia que el consorcio de HMA y *P. fluorescens* aplicados sobre las plantas de tomate de árbol intervienen beneficiosamente en el desarrollo de las plántulas, esto podría deberse a la síntesis de fitohormonas como las auxinas producidas tanto por las micorrizas como por las rizobacterias (Cuesta et. al, 2004).



**Figura 3.** Efecto de la interacción entre HMA y cepa Z5P6 sobre la biomasa aérea y radical de las plantas de tomate de árbol.

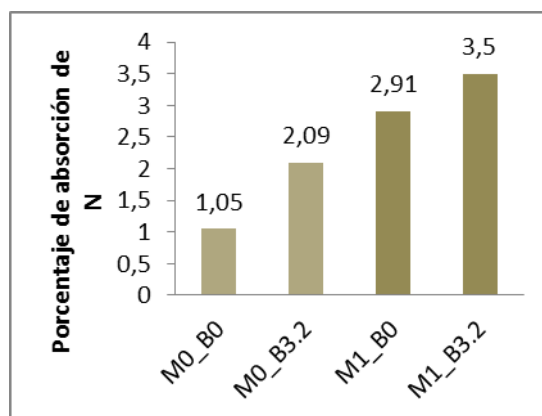
### 3.2 Análisis de nutrientes a nivel foliar

En la Figura 4, se puede observar, que la mayor absorción de fósforo (P) se encontró en las plantas de tomate de árbol con inoculación dual de micorrizas y la cepa Z5P6 de *P. fluorescens* en comparación con la inoculación simple de rizobacterias. Estas diferencias sugieren que la co-inoculación contribuye a mejorar la absorción del mineral. Barea *et. al*, (1983) indican que la cooperación entre *P. fluorescens* (bacterias solubilizadoras de fosfato) y los HMA es muy provechosa, ya que el P liberado en el suelo por los primeros microorganismos será absorbido por los segundos, que posteriormente lo harán disponible para la planta. De esta manera utilizar estos microorganismos puede llegar a sustituir a una gran cantidad de fertilizantes fosfatados, reduciendo considerablemente gastos energéticos y costos de producción agrícola (Raven, *et. al*, 1992).



**Figura 4.** Efecto de la interacción entre los HMA y la cepa Z5P6 sobre la absorción de fósforo en las plantas de tomate de árbol.

La mayor absorción de nitrógeno se presentó en las plantas co-inoculadas con HMA y *Pseudomonas fluorescens* (ver Figura 5). Similares resultados fueron obtenidos con la inoculación doble entre *Glomus* sp. cepa Zac19 y *Pseudomonas aeruginosa* cepa 11PS, que mejoraron el contenido de nitrógeno en plantas de alfalfa (Chamizo, A., *et al.*, 2009).



**Figura 5.** Efecto de la interacción entre los HMA y la cepa Z5P6 sobre la absorción de nitrógeno en las plantas de tomate de árbol

## 4 CONCLUSIONES

El porcentaje de supervivencia fue del 90% (126 plantas) de las cuales aquellas co-inoculadas con hongos micorrícicos arbusculares y la cepa Z5P6 de *P. fluorescens* (en concentración de  $6,0 \times 10^8$  UFC/ml) presentaron el mejor crecimiento del tomate de árbol, aumentando la altura en 1 vez, el área foliar en 2, la biomasa aérea y peso radicular en 3 veces respecto a los controles.

Las plantas micorrizadas y co-inoculadas con HMA y *P. fluorescens* cepa Z5P6 mostraron una mayor absorción de fósforo y nitrógeno, en contraste con las plantas control y aquellas con inoculación simple de rizobacterias, debido a la capacidad que presentan los microorganismos para descomponer la materia orgánica, logrando movilidad y mayor asimilación de nutrientes.

## 5 AGRADECIMIENTOS

A la Escuela Politécnica del Ejército por el financiamiento en el proyecto ejecutado y al personal del Laboratorio de Microbiología del Suelo, CEINCI-ESPE.

## REFERENCIAS

1. Arvind G., Praveen, R. and Pratibha, V. (2007). Characterization of Phosphate-Solubilizing Fluorescent Pseudomonads from the Rhizosphere of Seabuckthorn Growing in the Cold Deserts of Himalayas. *Curr Microbiol*, 56:73–79.
2. Barea, J. M.; Azcón, R., y Azcón-Aguilar, C. (1983). Interactions between phosphate solubilizing bacteria and VA mycorrhiza to improve plant utilization of rock phosphate in non acidic soils. 3rd International Congress on Phosphorus Compounds.



3. Chamizo, A.; Ferrera-Cerrato, R.; González-Chávez, M. C.; Ortiz-Solorio, C. A.; Santizo- Rincón, J. A.; Varela, L. y Alarcón, A. (2009). Inoculación de alfalfa con hongos micorrícicos arbusculares y rizobacterias en dos tipos de suelo. TERRA Latinoamericana, Volumen. 27, Número.3, p. 197-205.
4. Cuesta I., Ferrer A. y Rengifo E. (2004). Importancia de la inoculación dual de bacterias y *Glomus mosseae* sobre crecimiento y micorrización de plántulas de *Swietenia macrophylla* x *Mahagoni*. Revista Forestal Baracoa, 23: p 67–72.
5. Ferrera, R. y Alarcón, A. (2001). La microbiología del suelo en la agricultura sostenible, Ciencia Ergo Sum, 8: p175-183.
6. Garbaye J. (2007). Helper Bacteria: A New Dimension to the Micorrhizal Symbiosis. 128: p128-207.
7. Herrera-Peraza R, Furrazola E, Ferrer R, Fernández R. and Torres Y. (2004). Functional strategies of root hairs and arbuscular mycorrhizae in an evergreen tropical forest, Sierra del Rosario, Cuba. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 35: p113-123.
8. Jaizme Vega M. C. y Rodríguez Romero, A. (2008) Integración de microorganismos benéficos (Hongos micorrícicos y Bacterias rizosféricas) en Agrosistemas de las Islas Canarias, Agroecología 3: 33-39.
9. Palleroni, N. J. (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (Vol 2, Part B). New York: Springer, 323-370.
10. Parniske, Martín. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. Nature Reviews Microbiology, Vol6: p763-773.
11. Phillips, J & Hayman D. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc 55: 158-161.
12. Raven, Peter H., Evert Ray F y Eichhorn, Susan E. (1992). Biología de las plantas. Volumen 2. Capítulo 26, p 526-528. Editorial Reverté, S.A.
13. Saharan, B.S. y Nehra, V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research. LSMR-21.
14. Staley, T.E., Lawrence, E.G., and Nance, E.L. (1992). Influence of a plant growth-promoting pseudomonad and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus on alfalfa and birdsfoot trefoil growth and nodulation. Biology and Fertility of Soils, 14: p175-180.